

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **238778**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **419611**

(22) Data zgłoszenia: **28.11.2016**

(51) Int.Cl.

C07K 5/087 (2006.01)

A61K 38/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

(54)

Peptydomimetyki i ich zastosowanie w terapii nowotworu trzustki

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

04.06.2018 BUP 12/18

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

04.10.2021 WUP 27/21

(73) Uprawniony z patentu:

**INSTYTUT MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ
I KLINICZNEJ IM. M. MOSSAKOWSKIEGO
POLSKIEJ AKADEMII NAUK, Warszawa, PL
INSTYTUT HOMEOSTAZY SPÓŁKA
Z OGRANICZONĄ ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ,
Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**ANDRZEJ WOJCIECH LIPKOWSKI, Warszawa, PL
ALEKSANDRA MISICKA-KĘSIK, Pruszków, PL
PIOTR SOSNOWSKI, Czerwin, PL
ANNA KATARZYNA PUSZKO, Warszawa, PL
ANNA LASKOWSKA, Pruszków, PL
MAREK DURLIK, Warszawa, PL
KRZYSZTOF RÓŻYCKI, Warszawa, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Rafał Witek

PL 238778 B1

Opis wynalazku

Przedmiot wynalazku stanowią analogi peptydomimetyków nadające się do stosowania w terapii nowotworów trzustki. Opisane związki wykazują efekt cytostatyczny i cytotoksyczny w stosunku do komórek nowotworu trzustki, i nadają się do podawania różnymi drogami, zwłaszcza przez układ pokarmowy, w postaci tabletek, wlewów, zastrzyków lub implantów, w leczeniu i wspomaganiu terapii nowotworu trzustki.

Stan techniki

Przewodowy gruczolakorak trzustki (Pancreatic ductal adenocarcinoma; PDAC) jest nowotworem złośliwym charakteryzującym się złym rokowaniem, nawet przy wczesnym jego rozpoznaniu. Obecnie PDAC znajduje się na 7 miejscu jeśli chodzi o zgony spowodowane nowotworem. Przewiduje się, że liczba zachorowań na PDAC wzrośnie najbliższych latach. [Conroy T, Bachet JB, Ayav A et al. *European Journal of Cancer* 2016; 57: 10–22]. Obecnie stosowana chemioterapia, wykorzystuje leki takie jak gemcytabina, abraxane (nab-paklitaksel), 5-fluorouracyl, erlotynib czy terapię skojarzoną FOLFIRINOX. W leczeniu przerzutowego raka trzustki (nieoperacyjny) nowym standardem staje się nab-paklitaksel w skojarzeniu z gemcytabiną. Chemioterapia niesie za sobą duże ryzyko skutków ubocznych, takich jak: utrata włosów, mdłości, wymioty czy osłabienie. W obecnym czasie często stosuje się skojarzone metody leczenia, łączone są ze sobą różne rodzaje chemioterapii, a także chemioterapia z innymi metodami leczenia.

Część pacjentów otrzymuje chemioterapię po operacji chirurgicznej, aby wyeliminować komórki rakowe pozostałe po zabiegu (terapia adiuwantowa). W najgorzej rokujących przypadkach, (nieoperacyjny rak trzustki chemioterapię stosuje się w leczeniu paliatywnym mającym poprawić komfort życia pacjenta).

Gemcytabina jest analogiem nukleozydowym, który ze względu na podobieństwo do 2'-deoksy-cytydyny wbudowuje się zamiast niej do DNA. Skutkiem tego jest zaburzenie syntezy nici DNA i śmierć komórki. Jest to najczęściej zalecany chemioterapeutyk w leczeniu raka trzustki.

Abraxane składa się z cząsteczek leku paklitakselu związanego z albuminami. Paklitaksel działa antymitotyczne, hamując depolimeryzację mikrotubul, co uniemożliwia prawidłowe rozdzielenie chromatyd siostrzanych podczas podziału komórki. Wskutek zaburzenia mitozy następuje śmierć komórki.

5-fluorouracyl jest to fluorowana pochodna pirymidyny. 5-fluorouracyl jest przekształcany w komórce do biologicznie czynnych metabolitów: fosfodeoksyrybonukleotyd (5-dUMP) i trifosforan fluorourydyny (FUTP). 5-dUMP blokuje syntetazę tymidylową, a tym samym wytwarzanie kwasu tymidylowego, budulca DNA. FUTP wbudowuje się do RNA i blokuje fosfatazę uracylową, w wyniku czego powstaje RNA o nieprawidłowej budowie. Zaburzona synteza DNA i RNA, prowadzi do uszkodzenia i śmierci komórek.

Erlotynib jest inhibitorem kinazy tyrozynowej receptora typu I dla ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR lub HER1). Silnie hamuje fosforylację EGFR wewnątrz komórki, co prowadzi do zahamowania podziałów komórki i/lub jej śmierci.

FOLFIRINOX jest terapią polegającą na jednoczesnym zastosowaniu czterech chemioterapeutyków – kwasu folinowego (FOL), 5-fluorouracylu (F), irynotekanu (IRIN) oraz oksaliplatyny (OX).

Niestety gemcytabina oraz abraxane charakteryzują się niską skutecznością oraz uciążliwymi dla pacjenta efektami ubocznymi, szczególnie FOLFIRINOX będący potencjalną mieszanką silnie toksycznych związków [Conroy T, Desseigne F, Ychou M et al, *The New England Journal of Medicine* 2011; 364: 1817–1825]. Dodatkowo, w ostatnich latach obserwuje się zwiększoną liczbę przypadków oporności na gemcytabinę [Xie J, Jia Y, *Genes & Diseases* 2015; 2(4): 299–306].

Dlatego konieczne jest dostarczenie związków, które nadawałyby się do leczenia i/lub zapobiegania raka trzustki. Nieoczekiwanie cel ten został osiągnięty w niniejszym wynalazku.

Istota wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest związek wybrany spośród: L-tyrozylo-D-alanylo-L-feniloalanylo-cynamylopiperazyny lub L-tyrozylo-D-alanylo-L-tryptofylo-cynamylopiperazyny.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest związek wybrany spośród: L-tyrozylo-D-alanylo-L-feniloalanylo-cynamylopiperazyny lub L-tyrozylo-D-alanylo-L-tryptofylo-cynamylopiperazyny do stosowania w leczeniu lub zapobieganiu nowotworu trzustki.

Korzystnie, związek do stosowania według wynalazku jest stosowany w postaci przeznaczonej do podawania doustnego, iniekcyjnego lub dożylnego. Korzystnie, w postaci doustnej tabletki do podawania bezpośrednio do układu pokarmowego lub wlewu dożylnego do podawania obwodowego lub zastrzyku do iniekcji guza i jego okolic.

Korzystnie, związek do stosowania według wynalazku jest stosowany w postaci wielolekowej kompozycji farmaceutycznej, zwłaszcza zawierającej dodatkowo opioid o działaniu przeciwbólowym i/lub lek przeciwnowotworowy.

Korzystnie, związek do stosowania według wynalazku jest przeznaczony do stosowania w klasycznej chemioterapii raka trzustki prowadzonej przedoperacyjnie (terapia neo-adiuwantowa) lub pooperacyjnie (terapia adiuwantowa).

Szczegółowy opis wynalazku

Ogólnie, wynalazek dotyczy peptydomimetyków nadających się do stosowania w leczeniu i profilaktyce nowotworów trzustki.

Podczas poszukiwania nowych peptydomimetyków opioidów, które powinny wykazywać wysokie powinowactwo do receptorów opioidowych, szczególnie receptorów opioidowych mu, a jednocześnie działać jako antagonisty wobec leków opioidowych, takich jak morfina, fentanyl lub peptydów opioidowych, takich jak enkefalina lub bialina, nieoczekiwanie okazało się, że uzyskane peptydowe analogi opioidów wykazują również działanie cytotoksyczne w stosunku do komórek nowotworowych trzustki. Działanie to przejawia się zarówno poprzez efekt cytostatyczny i uśmiercanie komórek nowotworowych jak też poprzez rozluźnienie struktur guza i ułatwianie wnikania innych substancji czynnych do wnętrza guza.

Poniższe przykłady ilustrują efekt cytostatyczny i cytotoksyczny w stosunku do komórek nowotworu trzustki wywołowany zgodnie z wynalazkiem.

Peptydomimetyki według wynalazku mogą być uzyskane metodami znanymi ze stanu techniki, w szczególności sposobem opisanym w treści polskiego zgłoszenia patentowego numer P.402324. Poniżej opisy syntezy przykładowych peptydomimetyków mogą być łatwo zaadoptowane przez specjalistę do uzyskiwania dowolnego związku według wynalazku.

a) chlorowodorek tyrozylo-D-alanylo-glicylo-cynamonylopiperazyny

Trans-1-cynamonylo piperazynę acylowano t-Boc-Tyr-D-Ala-Gly, przy użyciu N,N-dicykloheksylokarbodiimidu za pomocą metody sprzęgania N-hydroksysukcynimidu w roztworze N,N-dimetyloformamidu. Po odsączeniu N,N'-dicykloheksylomocznika, surowy produkt pośredni został wytrącony wodą. Osad przemywano trzy razy wodą i wysuszono. T-butyloksykarbonylową grupę ochronną usunięto z użyciem 5% chlorowodoru w octanie etylu. Surowy produkt końcowy w postaci soli (chlorowodoru) wytrącano eterem etylowym. Surowy produkt oczyszczono za pomocą preparatywnej HPLC w układzie gradientu 0,5% kwas solny/etanol.

Jako czysty produkt izolowano chlorowodorek tyrozylo-D-alanylo-glicylo-cynamonylopiperazyny.

b) chlorowodorek tyrozylo-D-treonylo-glicylo-feniloalanylo-cynamonylopiperazyny

Trans-1-cynamonylo piperazynę acylowano t-Boc-Tyr-D-Thr-Gly-Phe, przy użyciu N,N-dicykloheksylokarbodiimidu za pomocą metody sprzęgania N-hydroksysukcynimidu w roztworze N,N-dimetyloformamidu. Po odsączeniu N,N'-dicykloheksylomocznika, surowy produkt pośredni został wytrącony wodą. Osad przemywano trzy razy wodą i wysuszono. T-butyloksykarbonylową grupę ochronną usunięto z użyciem 5% chlorowodoru w octanie etylu. Surowy produkt końcowy w postaci soli (chlorowodoru) wytrącano eterem etylowym. Surowy produkt oczyszczono za pomocą preparatywnej HPLC w układzie gradientu 0,5% kwas solny/etanol. Jako czysty produkt izolowano chlorowodorek tyrozylo-D-treonylo-glicylo-feniloalanylo-cynamonylopiperazyny (określanego jako peptydomimetyk 2).

c) dichlorowodorek tyrozylo-D-arginylo-cynamonylopiperazyny

Trans-1-cynamonylo piperazynę acylowano t-Boc-Tyr-D-Arg, przy użyciu N,N-dicykloheksylokarbodiimidu za pomocą metody sprzęgania N-hydroksysukcynimidu w roztworze N,N-dimetyloformamidu. Po odsączeniu N,N'-dicykloheksylomocznika, surowy produkt pośredni został wytrącony wodą. Osad przemywano trzy razy wodą i wysuszono. T-butyloksykarbonylową grupę ochronną usunięto z użyciem 5% chlorowodoru w octanie etylu. Surowy produkt końcowy w postaci soli (chlorowodoru) wytrącano eterem etylowym. Surowy produkt oczyszczono za pomocą preparatywnej HPLC w układzie gradientu 0,5% kwas solny/etanol. Jako czysty produkt izolowano dichlorowodorek tyrozylo-D-arginylo-cynamonylopiperazyny.

Analogicznie mogą być uzyskane szczególnie korzystne związki według wynalazku wybrane spośród:

L-tyrozylo-D-alanylo-L-fenylalanylo-cynamylopiiperazyny,
L-tyrozylo-D-alanylo-L-tryptofylo-cynamylopiiperazyny,
L-tyrozylo-D-treonylo-L-fenylalanylo-cynamylopiiperazyny lub
L-tyrozylo-D-treonylo-L-tryptofylo-cynamylopiiperazyny.

Wyżej wymienione związki otrzymuje się najpierw poprzez syntezę Boc-L-Tyr-D-Ala lub Boc-L-Tyr-D-Thr przy zastosowaniu żywicy 2-chlorotrylowej, gdzie wykorzystuje się Fmoc-zabezpieczone aminokwasy i metodę HATU/DIPEA w trakcie sprzęgania oraz 20% piperydynę w DMF w trakcie zdejmowania grup ochronnych. Po zdjęciu z żywicy za pomocą mieszaniny AcO:TFE:DCM, otrzymane produkty wykorzystuje się do zacylowania fenylalanylo-trans-1-cynamylopiiperazyny oraz tryptofylo-trans-1-cynamylopiiperazyny wykorzystując metodę TBTU/DIPEA. Grupa t-butyloksykarbonylowa usuwana jest za pomocą TFA:DCM.

Przykład 1

Fenylalanylo-trans-1-cynamylopiiperazyna została zacylowana za pomocą t-Boc-Tyr-D-Ala wykorzystując metodę TBTU/DIPEA. Produkt reakcji został wytrącony 10% NaHCO₃ i oddzielony od mieszaniny poreakcyjnej za pomocą filtracji. Osad został przemyty 3-krotnie wodą do momentu uzyskania neutralnego pH przesącza. Grupa t-butyloksykarbonylowa usunięta została za pomocą TFA:DCM (1:1). Surowy produkt oczyszczono za pomocą preparatywnego systemu HPLC w układzie gradientowym woda/metanol z dodatkiem 0.1% kwasu trifluorooctowego. Przeciwiwon wymieniono na Cl⁻ za pomocą żywicy jonowymiennej Dowex.

Oczyszczony produkt hydrochlorek tyrozylo-D-alanylo-fenylalanylo-cynamylopiiperazyny (zwany dalej TyrDAlaPheCyn) przetestowano na linii komórkowej ludzkiego raka trzustki CFPAC-1 przyrównując do komercyjnych leków gemcytabiny (gem) oraz 5-fluorouracylu (5FU). Komórki hodowano na pożywce IMDM z dodatkiem 10% (v/v) h.i. FBS, 2 mM L-glutaminy i 1% (v/v) penicyliny-streptomycyny w 37°C w wilgotnej atmosferze przy 5% CO₂. Komórki wysiano na 96 dołkowej płytce (3x10³ komórek/dołek) i inkubowano przez 24 h (37°C, 5% CO₂) w medium hodowlanym. Następnie do dołków dodano TyrDAlaPheCyn, gem oraz 5FU w roztworze 5% DMSO w stężeniach 0 (5% DMSO); 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1 mM w dołkach i inkubowano 24h (37°C, 5% CO₂). Żywotność komórek oznaczano za pomocą testu kolorymetrycznego MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium). Do każdego dołka dodano 20 µl odczynnika i inkubowano w tych samych warunkach przez kolejną godzinę. Intensywność absorbancji odczytano przy 490 nm. Stwierdzono, iż przy stężeniach 0,01–0,1 mM związek wykazuje zbliżone działanie do gem i 5FU. Natomiast w wyższych stężeniach wykazuje nawet 4-krotnie silniejsze działanie niż substancje komercyjne.

Na fig. 1 zaprezentowano wykres żywotności (%) komórek ludzkiego raka trzustki CFPAC-1 względem stężeń stosowanych związków po 24h inkubacji.

Przykład 2

Tryptofylo-Trans-1-cynamylopiiperazyna została zacylowana za pomocą t-Boc-Tyr-D-Ala wykorzystując metodę TBTU/DIPEA. Produkt reakcji został wytrącony 10% NaHCO₃ i oddzielony od mieszaniny poreakcyjnej za pomocą filtracji. Osad został przemyty 3-krotnie wodą do momentu uzyskania neutralnego pH przesącza. Grupa t-butyloksykarbonylowa usunięta została za pomocą TFA:DCM (1:1). Surowy produkt oczyszczono za pomocą preparatywnego systemu HPLC w układzie gradientowym woda/metanol z dodatkiem 0.1% kwasu trifluorooctowego. Przeciwiwon wymieniono na Cl⁻ za pomocą żywicy jonowymiennej Dowex.

Oczyszczony produkt hydrochlorek tyrozylo-D-alanylo-tryptofylo-cynamylopiiperazyny (zwany dalej TyrDTrpPheCyn) przetestowano na linii komórkowej ludzkiego raka trzustki CFPAC-1 przyrównując do komercyjnych leków gemcytabiny (gem) oraz 5-fluorouracylu (5FU). Komórki hodowano na pożywce DMDM z dodatkiem 10% (v/v) h.i. FBS, 2 mM L-glutaminy i 1% (v/v) penicyliny-streptomycyny w 37°C w wilgotnej atmosferze przy 5% CO₂. Komórki wysiano na 96 dołkowej płytce (3x10³ komórek/dołek) i inkubowano przez 24h (37°C, 5% CO₂) w medium hodowlanym. Następnie do dołków dodano TyrDTrpPheCyn, gem oraz 5FU w roztworze 5% DMSO w stężeniach 0 (5% DMSO); 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1 mM w dołkach i inkubowano 24h (37°C, 5% CO₂). Żywotność komórek oznaczano za pomocą testu kolorymetrycznego MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium). Do każdego dołka dodano 20 µl odczynnika i inkubowano w tych samych warunkach przez kolejną godzinę. Intensywność absorbancji odczytano przy 490 nm. Stwierdzono iż przy stężeniach 0,01–0,1 mM związek wykazuje zbliżone działanie do gem i 5FU. Natomiast w wyższych stężeniach wykazuje nawet 4-krotnie silniejsze działanie niż substancje komercyjne.

Na fig. 2 zaprezentowano wykres żywotności (%) komórek ludzkich raka trzustki PANC-1 względem stężeń stosowanych związków po 24h inkubacji.

Zastrzeżenia patentowe

1. Związek wybrany spośród:
L-tyrozylo-D-alanylo-L-feniloalanylo-cynamylopiiperazyny lub
L-tyrozylo-D-alanylo-L-tryptofylo-cynamylopiiperazyny.
2. Związek wybrany spośród:
L-tyrozylo-D-alanylo-L-feniloalanylo-cynamylopiiperazyny lub
L-tyrozylo-D-alanylo-L-tryptofylo-cynamylopiiperazyny
do stosowania w leczeniu lub zapobieganiu nowotworowi trzustki.
3. Związek do stosowania według zastrz. 2, **znamienny tym**, że jest stosowany w postaci przeznaczonej do podawania doustnego, iniekcyjnego lub dożylnego.
4. Związek do stosowania według zastrz. 2, **znamienny tym**, że jest stosowany w postaci doustnej tabletki do podawania bezpośrednio do układu pokarmowego lub wlewu dożylnego do podawania obwodowego lub zastrzyku do iniekcji guza i jego okolic.
5. Związek do stosowania według zastrz. 2, **znamienny tym**, że jest stosowany w postaci wielolekowej kompozycji farmaceutycznej, korzystnie zawierającej dodatkowo opioid o działaniu przeciwbólowym lub/i lek przeciwnowotworowy.
6. Związek do stosowania według zastrz. 2, **znamienny tym**, że jest przeznaczony do stosowania w klasycznej chemioterapii raka trzustki prowadzonej przedoperacyjnie (terapia neo-adiuwantowa) lub pooperacyjnie (terapia adiuwantowa).

Rysunki

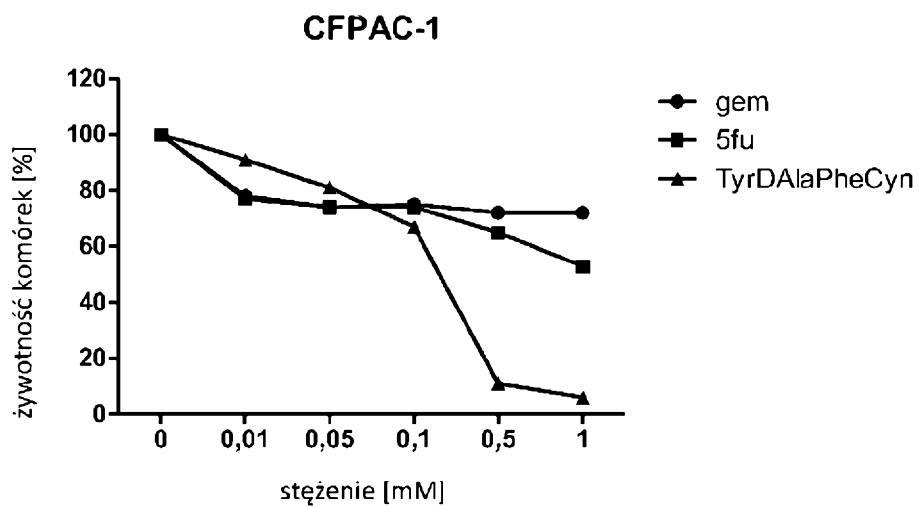


Fig. 1

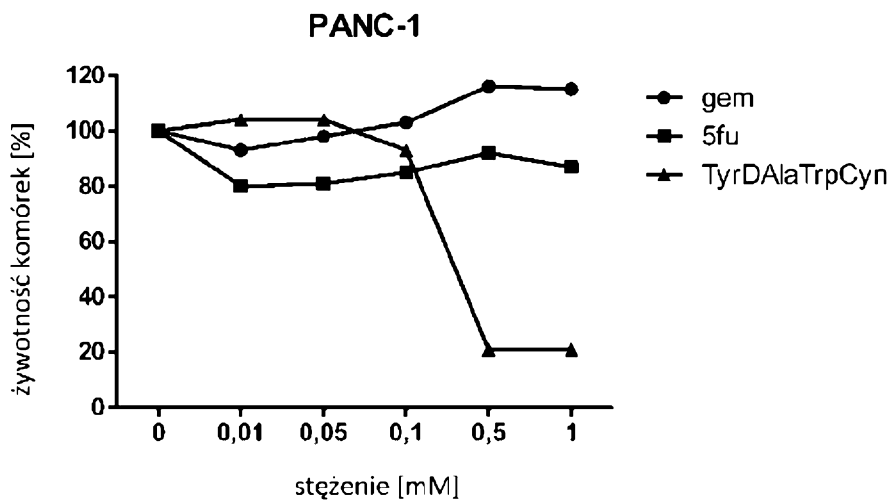


Fig. 2